

氏 名 真 崎 雄 一

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 2 2 0 号

学位授与の日付 平成 8 年 3 月 2 1 日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 インテグリンによる色素上皮細胞の分化形質発現の調節

論文審査委員 主 査 教 授 長 濱 嘉 孝

教 授 野 田 昌 晴

教 授 江 口 吾 朗

助教授 児 玉 隆 治

一般に分化した細胞は、組織内においてその分化形質を維持し続けることが知られている。しかし、傷の修復あるいは腫瘍・癌の形成のような病理学的な状態では、一度分化した細胞であってもその分化形質を失い、全く異なった分化形質に変わることが観察されている。なかでもイモリなどの有尾両生類で見られるウォルフ再生は、分化形質の維持ということを考えるうえで非常に興味深い現象である。この再生では、本来のレンズが取り除かれると、失ったレンズを補うためにこれまで分化していた背側の虹彩色素上皮細胞がその分化形質を失い、レンズ細胞へ分化することが知られている。この現象は現在、イモリ、ニワトリ、ヒトの色素上皮細胞を使って培養条件下で再現することができ、分化形質転換（分化転換）と呼ばれている。この色素上皮細胞の分化転換系では、培地を調節することによって容易に色素上皮細胞、脱分化細胞、レンズ細胞にすることができるが、その一方で細胞外マトリックスもまた分化状態に大きな影響を与えていることが知られている。例えば、ニワトリの網膜色素上皮細胞をコラーゲン上で培養するとレンズ細胞への分化転換が抑えられ、分化形質を維持し続けることが報告されている。また、色素上皮細胞は網膜性神経細胞へも分化転換することができるが、この際、色素上皮細胞をラミニン基質上で培養すると神経性網膜細胞への分化転換が促されることも報告されている。このように細胞外マトリックスは、色素上皮細胞の分化状態に大きな影響を及ぼしているが、近年インテグリンがこれらの細胞外マトリックスの主要なレセプターとして明らかになってきている。

インテグリンは、 α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロダイマーであり、その組み合わせによってコラーゲン、ファイブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンのような細胞外マトリックスを構成するタンパク質と結合する。また、最近になってノックアウトマウスの実験から、インテグリンは発生及び細胞分化において重要な役割を果たしていることが報告されている。

しかし、細胞外マトリックスは色素上皮細胞の分化転換において極めて重要な働きをしていることが知られているにも関わらず、従来そのレセプターであるインテグリンの色素上皮細胞の分化転換における役割については全く調べられていなかった。そこで、本研究では、色素上皮細胞の分化における細胞外マトリックスの役割についてインテグリンに注目し調べることにした。

まず、色素上皮細胞の分化における細胞外マトリックスの役割を明らかにするために、細胞外マトリックスを構成している様々なタンパク質に対して色素上皮細胞あるいは脱分化細胞がどのような接着性を示すのかを調べた。脱分化細胞では、色素上皮細胞と比べファイブロネクチンを除く調べた全ての基質に対して接着性の低下を示すことがわかった。そこで、さらにこの接着性の変化の原因を明らかにする目的で、細胞外マトリックスの主なレセプターであるインテグリンの発現について調べた。色素上皮細胞では $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 8$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 5$ インテグリンが発現しており、その発現は色素上皮細胞と脱分化細胞ではほぼ同じであることがわかった。さらにこれらの細胞で最も発現量の多かった $\beta 1$ インテグリンについてタンパク質レベルで解析すると、 $\beta 1$ インテグリンタンパク質もまた脱分化過程で変化していないことがわかった。しかし、 $\beta 1$ インテグリンタンパク質

の分布を調べてみると色素上皮細胞にはみられた基質との接着を示すfocal contactが脱分化細胞では消失していることがわかった。さらに抗体を使って β 1 インテグリンを介した接着を阻害すると、色素上皮細胞では、形態が変化し培養器からはがれる傾向も認められたが、脱分化細胞ではなんら影響が見られなかった。また、インテグリンはリン酸化を受けることによってその機能を失うことが知られているが、色素上皮細胞と脱分化細胞で β 1 インテグリンのリン酸化を調べた結果、脱分化細胞のみにこのリン酸化が認められた。このようなことから脱分化細胞では β 1 インテグリンは存在するものの、レセプターとしては機能していないことが示唆された。さらに脱分化細胞ではインテグリンを介した接着が消失することから、抗体を使って色素上皮細胞の β 1 インテグリンを介した接着を阻害することによって脱分化させることが可能であるか調べた。その結果、その形態及び遺伝子の発現パターンは脱分化細胞と似たものになった。しかし、一方で脱分化細胞ではインテグリンを介した接着が行われていないにも関わらず、インテグリンが基質と結合することによってはじめてリン酸化されるp125FAKやパキシリンのチロシン残基のリン酸化がみられた。これまでに、RSVによって形質転換した細胞ではインテグリンを介した接着と無関係にp125FAKのチロシン残基のリン酸化がみられ、このため細胞は基質との接着に無関係に増殖していることが考えられている。したがって、脱分化細胞においてもp125FAKやパキシリンがリン酸化されていることによって基質と接着することなく増殖できる可能性が示唆された。

これら本研究を通じて得た結果から色素上皮細胞の分化形質の維持において β 1 インテグリンが非常に重要な役割を果たしており、また脱分化過程でその活性を失うことで、形態及び遺伝子発現の調節に深く関与していることがはじめて示唆された。

審査結果の要旨

脊椎動物の色素上皮細胞は、一般に、細胞培養の条件下でレンズ細胞に分化転換することが知られている。本論文の内容はニワトリ胚の完全に分化した色素上皮細胞について、その分化及びレンズ細胞への分化転換の調節にインテグリンと細胞外基質がいかに関与しているかを明らかにしようとした研究である。

インテグリン分子種が、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外基質構成分子の受容体として、細胞と細胞外基質との接着及びシグナルトランスダクションに深く関与しているとの想定に基づき、ニワトリのインテグリンの各分子種のcDNAをクローン化し、それらをプローブとして色素上皮細胞の分化過程及び分化転換過程でのインテグリン遺伝子及びその産物の発現様態を解した。その結果、 $\beta 1$ -インテグリンが主要なインテグリン分子として働いていることが明らかとなった。そこで、抗 $\beta 1$ -インテグリン抗体を分化した培養色素上皮細胞に作用させたところ、色素上皮細胞は、細胞外基質との接着を顕著に阻害され、脱分化することが明らかとなった。

この結果を踏まえ、更に解析を進めた。その結果、色素上皮細胞が、レンズ細胞へ分化転換する過程で経由する多能的分化状態では、 $\beta 1$ -インテグリンは分化した色素上皮細胞と同程度に発現されているものの、serine残基が磷酸化されることによって、細胞外基質分子の受容体としての機能を失い、ために、同細胞種の細胞外基質との接着性が著しく低下すると共に、分化形質発現の安定な維持に要求されるインテグリンを介しての細胞外基質からの情報伝達も失われることを実験的に示した。

この研究成果は、細胞の分化形質発現とその安定な維持、さらには分化転換におけるインテグリンと細胞外基質との役割を色素上皮細胞について、はじめて具体的に示唆したもので、学術的価値の高いものである。よって、本論文は、博士学位論文としての価値があるものと評価した。

試験結果については、提出された博士学位論文の内容を口頭発表させ、質疑応答を重ねて、研究方法の妥当性をはじめ、研究内容及び申請者の研究能力を詳細に審査検討した。また、生物科学の一般的学識及び語学力についても、審査をおこなった。その結果、学位論文の内容及び学識は博士の学位を取得するに足るものと判定した。また、語学力については、今後研究者として要求される語学力としての英語の能力があると判定した。